



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Liliana Cassol

Extração de compostos bioativos do hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) por micro-ondas e seu encapsulamento por atomização e liofilização

Porto Alegre

2018

Liliana Cassol

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO HIBISCO (*Hibiscus sabdariffa* L.)
POR MICRO-ONDAS E SEU ENCAPSULAMENTO POR ATOMIZAÇÃO E
LIOFILIZAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Cassol, Liliana

Extração de compostos bioativos do hibisco
(*Hibiscus sabdariffa* L.) por micro-ondas e seu
encapsulamento por atomização e liofilização / Liliana
Cassol. -- 2018.

122 f.

Orientador: Caciano Pelayo Zapata Noreña.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. hibisco. 2. extração assistida por micro-ondas.
3. compostos bioativos. 4. microencapsulamento. 5.
estabilidade. I. Noreña, Caciano Pelayo Zapata,
orient. II. Título.

Liliana Cassol

DISSERTAÇÃO

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO HIBISCO (*Hibiscus sabdariffa* L.) POR MICRO-ONDAS E SEU ENCAPSULAMENTO POR ATOMIZAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau em

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:/...../.....

Pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Homologada em:/...../.....
Por:

Prof^a. Dr^a. Roberta Cruz Silveira Thys
Banca – UFRGS

Prof^a. Dr. Adriano Brandelli
Coordenadora do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos (PPGCTA)

Prof^a. Dr^a. Juliane Elisa Welke
Banca – PPGCTA/UFRGS

Prof^a. Dr^a. Carolina Pereira Kechinski
Banca – UFCSPA

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos -
ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo!

À minha família, que mesmo longe esteve presente. À minha Mãe agradeço por ser tudo em minha vida! Agradeço pelo apoio, incentivo, infinita preocupação e amizade. Pelo colo, mesmo a distância. Ao meu Pai, meu exemplo, meu herói. À Sandra, pelas palavras e apoio de sempre e a Micheli por me manter atualizada com as fotos lindas da nossa Ana Beatriz, que agora poderei acompanhar mais de perto. Ao Leandro, que nos dá forças lá de cima e a sua família que ficou aqui e nos dá vontade de continuar! À Cláudia, que sempre está ao meu lado, mesmo com todas as brigas. Amo vocês além daqui! E a Mel e Mona, minhas gatas, que só não foram para o laboratório, mas participaram de perto de todas as alegrias, todo o choro e toda elaboração da escrita. Amo vocês meus anjinhos bagunceiros! E Arnold, Ana e Nanda, amigos e prima queridos, obrigada pela amizade, mas acima de tudo, pelo imenso amor e cuidado com as gurias, quando eu não pude atendê-las.

Meus agradecimentos ao meu orientador, professor Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida, orientação, enriquecimento dos meus conhecimentos com suas argumentações científicas, e principalmente as longas horas de conversa e bom convívio nestes dois anos e meio de trabalho. Orientador é uma palavra ideal para defini-lo: foi sob sua tutela que guiei meus passos. Muito obrigada!

Ao Professor Eliseu Rodrigues, pelo auxílio com o HPLC, incentivo, atenção e por não me deixar surtar (ou só um pouquinho).

Aos Professores Plinho Hertz, Adriano Brandelli e Eder Lima pelo apoio com equipamentos e materiais.

Ao Professor Flávio Burg e integrantes da Horta Comunitária da Lomba do Pinheiro, pela parceria.

À professora Ana Paula Manera (Ori) pela amizade, carinho e incentivo em mais essa etapa. E a madrinha Elizangela Gonçalves de Oliveira pelo apoio de perto e ajuda nessa fase. Da Unipampa pra vida!

Ao Dias da Cruz, pela acolhida e pelo “suporte” proporcionado. E as amigas que reencontrei por lá... Lia (estrelinha), Raquel e Camila.

Ao Rafa, pela preciosa amizade, conversas profundas e momentos de riso. E a todos os amigos que me apoiaram de longe e entenderam a minha ausência. Muito obrigada, de coração!

À Kamila, que foi o meu presente do mestrado pra vida. Pela amizade, risos, aprendizados, consolos e xingamentos. Te amo meu unicórnio ogro!

À Luiza e Alessandra pelos conhecimentos passados, ajudas e amizade, a convivência no laboratório não foi grande, mas na vida está sendo! Obrigada gurias!

À minha primeira IC Ana Paula por todo apoio nas análises, toda troca de conhecimentos e pela infinita amizade, mesmo depois de ela me abandonar. E a Rafa, por todo auxílio nas análises e atenção.

Ao Junior (Cassiano) que apesar das brigas, foi mais que um colega nesses longos dois anos! Agradeço sempre! E a Mari, que chegou depois, mas sempre esteve presente, desde o corte do hibisco! Vocês alegraram essa jornada!

Às bolsistas Julia, por todos os ensinamentos, e Duélen pelas risadas e aos colegas Loleny pela atenção e resolução dos meus problemas e Fernanda pelo companheirismo.

À Luana, melhor vizinha, Carol, pelas visitas, Andressa, pelo carinho e ao Maurício, por toda ajuda e conhecimento transmitido.

Ao Edgar, Diogo, Ana e Michele por todo suporte e apoio com os equipamentos e análises.

À Universidade Federal do Rio Grande do e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos por possibilitarem a realização deste trabalho. E ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os cálices do hibisco possuem uma grande quantidade de compostos bioativos responsáveis pela sua atividade antioxidante. O presente trabalho teve como objetivos a obtenção de extratos contendo esses compostos bioativos em solução aquosa com 2 % de ácido cítrico por extração assistida por micro-ondas (EAM) e o encapsulamento desses extratos por atomização e liofilização utilizando polidextrose (PD), proteína isolada do soro de leite (WPI) e a mistura destes na concentração de 10 %. Previamente foram estudados três métodos de extração, o primeiro usando somente EAM a 200, 300 e 700 W de potência, e tempos de 2, 5 e 8 minutos; o segundo consistiu de dois períodos, a extração aquosa ácida com tempos de 1, 2, 4, 6, 18 e 24 horas seguida de EAM nas potências de 200, 300 e 700 W; o terceiro consistiu de EAM seguida de extração aquosa ácida, nos mesmos tempos e potências citados para o segundo método. Os resultados indicaram que a melhor condição do primeiro método foi a 700 W e 8 min, do segundo método realizada a 6 horas de extração aquosa ácida, seguida de EAM a 700 W por 8 min e do terceiro método, EAM a 700 W por 8 min seguida de 6 horas de extração aquosa ácida. Quando os três métodos foram comparados, a melhor condição de extração foi aquela obtida no terceiro método: $1,63 \text{ mg}_{\text{delfinidina-3-sambubiosídeo}} \cdot \text{g}^{-1}$; $29,62 \text{ mg}_{\text{EAG}} \cdot \text{g}^{-1}$; $133,25 \mu\text{mol}_{\text{ET}} \cdot \text{g}^{-1}$ para antocianinas, fenólicos totais e atividade antioxidante por ABTS, respectivamente. Para avaliar o efeito da extração obtida somente por EAM, os extratos obtidos por extração exaustiva com metanol por 25 min e EAM a 700 W e 8 min foram quantificados por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, sendo encontrados 13 compostos (6 ácidos fenólicos, 2 antocianinas e 5 flavonóides derivados da quercetina, kaempferol e miricetina). Os compostos fenólicos majoritários foram o ácido 3-cafeoilquínico ($2,58$ e $1,32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) e ácido 5-cafeoilquínico ($1,71$ e $0,90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) para extração exaustiva e EAM, respectivamente. Esse mesmo extrato (700 W e 8 min) foi encapsulado por atomização ($160 \text{ }^\circ\text{C}$) e liofilização ($-68 \text{ }^\circ\text{C}$ por 54 horas). Os pós obtidos foram avaliados quanto aos teores de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais, atividade antioxidante (ABTS, DPPH e HRSA), medidas por análises espectrofotométricas, atividade de água, umidade, higroscopicidade, solubilidade, eficiência de encapsulação, cor, análise termogravimétrica, temperatura de transição vítrea, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microestrutura (MEV). Os pós atomizados tiveram menor atividade de água (0,14 a 0,17), umidade (3,4 a 4,5 %), higroscopicidade (23,9 a 34,1 %), solubilidade (86 a 98,2 %) e eficiência de encapsulação (51,62 a 84,52 %) do que os pós liofilizados. Os resultados do FTIR mostraram que os encapsulantes não interagiram quimicamente, visto que não foram

observados mudanças na frequência dos picos; as provas termogravimétricas indicaram que os pós apresentaram a mesma tendência nas perdas de massa. Na análise de microestrutura foi observado um melhor desempenho nas micropartículas atomizadas com PD, as quais mostraram partículas mais esféricas e sem tendência de atração e aderência entre si. Foram obtidas retenções de 38 a 77 % para antocianinas monoméricas totais, 42 a 89 % para compostos fenólicos totais, e entre 33 e 90 % para atividade antioxidante nos pós obtidos. O pó encapsulado liofilizado com 10 % de povidona mostrou uma maior retenção de antocianinas (77 %), atividade antioxidante por DDPH (90 %) e HRSA (74 %), entretanto com maior higroscopicidade (39,4 %). As provas aceleradas de estocagem (umidades relativas de 75 e 90 % em temperaturas de 40 e 60 °C) realizadas em todos os pós encapsulados, após 30 dias, indicaram que o tratamento liofilizado com 10 % de PD foi o que apresentou melhores resultados a essas condições, retendo 75 % dos compostos fenólicos, com atividades antioxidantes medidas por ABTS, DPPH e HRSA de 75, 90 e 74 %, respectivamente, existentes no extrato original. O pó obtido tem potencial para aplicação em alimentos, portanto, devido ao hibisco ser uma matriz com ampla composição de compostos bioativos.

Palavras-chave: hibisco, extração assistida por micro-ondas, compostos bioativos, microencapsulamento, estabilidade.

ABSTRACT

The hibiscus calyces contain a high quantity of bioactive compounds responsible for their antioxidant activity. The present paper was aimed at the production of extracts containing those bioactive compounds in acidified aqueous solution 2 % of citric acid by microwave assisted extraction (MAE) and the encapsulation of those extracts by spray drying and freeze-drying using polydextrose (PD), whey protein isolate (WPI) and their mixture in the concentration of 10 %. Previously three methods of extraction were studied, the first using only MAE at 200, 300 and 700 W of power, and times of 2, 5 and 8 minutes; the second consisted of two steps, the acid aqueous extraction with times of 1, 2, 4, 6, 18 and 24 hours followed by MAE at the powers of 200, 300 and 700 Watts; the third consisted of MAE followed by acid aqueous extraction, in the same times and powers mentioned for the second method. The results indicated that the best condition of the first method was 700 W and 8 minutes, the second method performed at 6 hours of acid aqueous extraction, followed by MAE at 700 W for 8 minutes and the third method, MAE at 700 W for 8 minutes followed by 6 hours of acid aqueous extraction. When the three methods are compared, the best condition of extraction was obtained in the third method: $1.63 \text{ mg delphinidin-3-sambubioside} \cdot \text{g}^{-1}$; $29.62 \text{ mg GAE} \cdot \text{g}^{-1}$; $133.25 \text{ } \mu\text{mol TE} \cdot \text{g}^{-1}$ for total monomeric anthocyanins, total phenolic compounds and antioxidant activity by ABTS, respectively. To evaluate the effect of the extraction obtained only by MAE, the extracts obtained by exhaustive extraction with methanol for 25 minutes and MAE at 700 W and 8 minutes were quantified by HPLC-DAD-ESI-MS/MS, was found 13 compounds (6 phenolic acids, 2 anthocyanins and 5 flavonoids derived from quercetin, kaempferol and myricetin). The phenolic compounds majorities were acid 3-caffeoylquinic ($2.58 \text{ e } 1.32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) and acid 5-caffeoylquinic ($1.71 \text{ e } 0.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) for exhaustive extraction and MAE, respectively. That same extract (700 W and 8 minutes) was encapsulated by spray drying (160 °C) and freeze-drying (-68 °C for 54 hours). The obtained powders were evaluated about the levels of total phenolic compounds, total monomeric anthocyanins, antioxidant activity (ABTS, DPPH e HRSA), measured by spectrophotometric analysis, water activity, moisture, hygroscopicity, solubility, encapsulation efficiency, color, thermogravimetric analysis, glass transition temperature, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and microstructure (MEV). The spray dried powders had lower water activity (0.14 to 0.17), moisture (3.4 to 4.5 %), hygroscopicity (23.9 to 34.1 %), solubility (86 to 98.2 %) and encapsulation efficiency (51.62 to 84.52 %) than the freeze-dried powders. The results of FTIR showed that the encapsulants did not interact chemically, since changes

were not observed on the frequency of the peaks; the thermogravimetric tests indicated that the powders presented the same tendency on the mass loss. On the microstructure analysis a better perform was observed on the spray dried microparticles with PD, which showed more spherical particles and with no tendency of attraction and adherence between them. Were obtained retentions of 38 to 77 % for total monomeric anthocyanins, 42 to 89 % for total phenolic compounds and between 33 and 90 % for antioxidant activity in the obtained powders. The encapsulated power by freeze-drying, with 10 % of polydextrose, was showed higher retention of anthocyanins (77 %), antioxidant activity by DDPH (90 %) and HRSA (74 %), however with higher hygroscopicity (39.4 %). The accelerated tests of storage (relative humidity of 75 and 90 % in temperatures of 40 and 60 °C) performed in all the encapsulated powders, after 30 days, indicated that the freeze-drying treatment with 10 % of PD has the best behavior in those conditions, retaining 75 % of the phenolic compounds, with antioxidant activities measured by ABTS, DPPH and HRSA of 75, 90 and 74 %, respectively, present in the original extract. The obtained powder has potential for application in foods, therefore, due to the hibiscus being a matrix with ample composition of bioactive compounds.

Keywords: hibiscus, microwave assisted extraction, bioactive compounds, microencapsulation, stability.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Partes estruturais do hibisco.....20
- Figura 2.** Estrutura química básica das antocianinas.....23

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Antocianinas monoméricas totais (A), compostos fenólicos totais (B) e atividade antioxidante (C) obtidos na extração assistida por micro-ondas.....39
- Figura 2.** Teor de antocianinas monoméricas totais nas potências 200 (A), 300 (B) e 700 W (C), respectivamente.....43
- Figura 3.** Compostos fenólicos totais (A, B, C) nas potências 200, 300 e 700 W, respectivamente.....44
- Figura 4.** Atividade antioxidante (A, B, C) nas potências 200, 300 e 700 W, respectivamente.....45
- Figura 5.** Antocianinas monoméricas totais (A, B, C) nas potências 200, 300 e 700 W, respectivamente.....46
- Figura 6.** Compostos fenólicos totais (A, B, C) nas potências 200, 300 e 700 W, respectivamente.....47
- Figura 7.** Atividade antioxidante (A, B, C) nas potências 200, 300 e 700 W, respectivamente.....48

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Curvas de análises termogravimétricas (TGA) do extrato aquoso dos cálices de hibisco microencapsulado com PD e WPI por secagem por atomização e liofilização.....74
- Figura 2.** Espectros FTIR do extrato de hibisco, PD, WPI, e pós microencapsulados por atomização e liofilização.....76
- Figura 3.** Microscopia eletrônica de varredura do extrato aquoso dos cálices de hibisco microencapsulado com PD e WPI por secagem por atomização e liofilização.....78
- Figura 4.** Efeito da temperatura e umidade relativa em antocianinas monoméricas totais e compostos fenólicos totais no extrato aquoso dos cálices de hibisco microencapsulado por secagem por atomização (A, B) e liofilização (C, D).....82
- Figura 5.** Efeito da temperatura e umidade relativa na atividade antioxidante por ABTS, DPPH e HRSA do extrato aquoso dos cálices de hibisco microencapsulado com PD e WPI por secagem por atomização (A, B, C) e liofilização (D, E, F).....84

Figura 6. Gráfico de carregamento de PC1-PC2 para o extrato aquoso dos cálices de hibisco microencapsulado com PD e WPI por secagem por atomização e liofilização (A) e Escore de pontuação e Grupos (I, II, III) criados pela análise de componentes principais, levando em consideração a correlação observada entre as propriedades estudadas dos pós (B).....88

Figura S1. Coloração do extrato aquoso dos cálices de hibisco microencapsulado.....98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Esqueletos estruturais básicos de compostos fenólicos.....	21
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Parâmetros colorimétricos dos extratos obtidos.....	41
--	----

Tabela 2. Quantificação dos compostos fenólicos do hibisco nos extratos provenientes da extração exaustiva e da EAM a 700 W e 8 min obtidos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.....	53
--	----

Tabela S1. Caracterização dos compostos fenólicos do hibisco obtidos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.....	62
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Caracterização do extrato aquoso dos cálices de hibisco microencapsulados com PD e WPI por secagem por atomização e liofilização.....	71
--	----

Tabela 2. Parâmetros de cores do extrato aquoso dos cálices de hibisco microencapsulados com PD e WPI por secagem por atomização e liofilização.....	73
---	----

Tabela 3. Teores de antocianinas monoméricas totais (TMA), compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante (ABTS, DPPH e HRSA) do extrato aquoso dos cálices de hibisco e pós microencapsulado com PD e WPI por secagem por atomização e liofilização logo após o processo de encapsulamento.....	80
--	----

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Pearson entre as diferentes características e propriedades do extrato aquoso dos cálices de hibisco microencapsulado com PD e WPI por secagem por atomização e liofilização.....	87
---	----

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Teores de antocianinas monoméricas totais (TMA), compostos fenólicos totais (TCF) e atividade antioxidante por ABTS dos extratos dos cálices de hibisco obtidos nos três diferentes tratamentos de extração.....	99
---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	18
OBJETIVO GERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
CAPÍTULO 1 - Revisão bibliográfica	19
1. Hibisco.....	19
2. Compostos fenólicos.....	20
2.1 Antocianinas.....	21
3. Atividade antioxidante.....	23
4. Processos de extração.....	25
4.1. Micro-ondas.....	25
5. Microencapsulação.....	26
5.1. Atomização (spray drying).....	28
5.2. Liofilização.....	28
6. Material de parede.....	29
6.1. Proteína isolada do soro de leite (WPI).....	30
6.2. Polidextrose (PD).....	31
CAPÍTULO 2 - Estudo da extração de compostos fenólicos de cálice de hibisco (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) mediante a extração assistida por micro-ondas	32
CAPÍTULO 3 - Estudo do encapsulamento do extrato de compostos bioativos do hibisco (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) utilizando polidextrose e proteína isolada do soro de leite	63
CAPÍTULO 4 - Discussão geral	99
PERSPECTIVAS	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

INTRODUÇÃO

É uma tendência mundial de que os alimentos sejam vistos não apenas como fonte de nutrientes com apelo sensorial, mas como fonte de bem-estar e saúde para os indivíduos (Favaro-Trindade et al., 2008). O consumo de alimentos funcionais é de fundamental importância para proporcionar à população um envelhecimento com melhor qualidade de vida, minimizando problemas de saúde e a patogênese de várias doenças relacionadas à idade (OMS, 2007; Mecocci et al., 2000). O desenvolvimento de novos alimentos funcionais requer o uso de tecnologias que incorporem ingredientes bioativos em alimentos, sem reduzir a sua biodisponibilidade e funcionalidade (Poshadri e Kuna, 2010; Rein et al., 2012)

Estudos sobre o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento de um número de doenças graves, tais como determinados tipos de cancro, cardiovasculares e degenerativas, assim como à ação dos antioxidantes, presentes nos alimentos, contra estas doenças tem sido estudados (Barhé e Tchouya, 2016; Li et al., 2014; Dijk et al., 2016). Devido a essas descobertas, hoje em dia as pessoas começam a ter uma maior preocupação com a saúde, resultando numa reeducação alimentar e a procura de alimentos funcionais para compor as refeições (Nachtigall et al., 2004; Sun, 2008; Denver e Christensen, 2015).

Os compostos bioativos possuem ação metabólica ou fisiológica específica sobre o crescimento, desenvolvimento, manutenção de um organismo vivo, tecido ou célula (BRASIL, 2002). Os compostos bioativos são obtidos a partir de fontes naturais e classificados em diferentes categorias em base a sua estrutura e funções químicas: carotenoides, compostos fenólicos, alcaloides, compostos contendo nitrogênio e compostos organossulfurados (Hamri et al., 2011; Jeong et al., 2015). Dentre estes compostos bioativos, os polifenóis ganham atenção por demonstrarem diversos efeitos benéficos na saúde humana, tais como atividades antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladoras (Morton et al., 2002; Shayganni et al., 2016; Wahyuningsih et al., 2017). Alguns desses compostos fenólicos, como as antocianinas, são considerados potenciais corantes naturais, em substituição aos corantes sintéticos, podendo ser utilizados na indústria (Fang e Bhandari, 2010).

Os compostos bioativos são amplamente utilizados na preparação de suplementos alimentares, ingredientes alimentares funcionais, corantes, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos e cosméticos (Cissé et al., 2012; Kalla et al., 2015). Um dos métodos mais empregados para a separação é a extração por solventes sob altas temperaturas, sendo os solventes mais utilizados o metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (Naczki e Shahidi, 2004). Entretanto, o uso de

solventes orgânicos apresenta uma série de desvantagens, tais como toxicidade, volatilidade e inflamabilidade (Ricárdez et al., 2011). Com o intuito de evitar o emprego de altas temperaturas e aumentar as taxas de extração têm sido propostos os métodos de extração assistida por micro-ondas, ultrassom e de fluidos supercríticos e comprimidos (Dai e Mumper, 2010).

O interesse pela obtenção de compostos bioativos mediante extração assistida por micro-ondas tem aumentado (Terigar et al., 2010; Petigny et al., 2014; Xiong et al., 2016). Esta tecnologia se baseia na penetração das micro-ondas na matriz, interagindo com as moléculas polares, tais como água, que faz com que elas se agitem e se friccionem, produzindo calor e o aumento da pressão no interior das células das plantas, resultando no aumento da difusão e transferência do solvente através da matriz celular, que leva a ruptura das células e a consequente liberação dos compostos bioativos (Wu et al., 2012), reduzindo assim, o tempo de extração, com a consequente redução do uso de energia se comparado com os métodos convencionais de separação por aquecimento.

Após separação dos compostos bioativos de suas matrizes, o estudo dos métodos de proteção e dos mecanismos de liberação controlada dessas moléculas durante o processamento, armazenamento e o metabolismo, estão entre os grandes desafios dos pesquisadores da indústria alimentar. Dessa forma, o desenvolvimento de dispositivos de encapsulamento destes compostos, constitui um mercado em crescimento (Tavares et al., 2014). Também denominados de materiais de parede, eles oferecem proteção destes componentes contra a ação do meio ambiente, assegurando a liberação controlada na formulação (Tavares et al., 2011).

Entre as propriedades que deve possuir o material encapsulante estão as características físico-químicas, como a solubilidade, massa molar, temperatura de transição vítrea, cristalinidade, viscosidade, higroscopicidade e difusividade (Rosenberg et al., 1990; Azeredo, 2005), além de apresentar um bom mecanismo de liberação controlada e custos (Brazel, 1999; Azeredo, 2005).

O hibisco conhecido também como hibiscus, roselia, groselha, azedinha, quiabo azedo, caruru-azedo, caruru-da-guiné e quiabo-de-angola (Martins, 1990) é utilizado como planta medicinal e alimento funcional em diferentes países (Moura et al., 2018). Os cálices são a parte mais utilizada e estudada do hibisco, principalmente devido a serem ricos em compostos bioativos como antocianinas e outros flavonóides, ácidos orgânicos e polissacarídeos que são responsáveis por suas atividades antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras e anticolesterol (Da-Costa-Rocha et al., 2014; Formagio et al.,

2015). O hibisco está inserido na indústria de alimentos como fibra, antioxidante e corante (Patel, 2014).

Atualmente, o cultivo do hibisco vem sendo realizado em hortas comunitárias no Estado do Rio Grande do Sul, como é o caso da horta comunitária da Lomba do Pinheiro em Porto Alegre, com o objetivo de incentivar e intensificar o consumo deste produto no dia-a-dia da população em geral, seja na preparação de chás, sucos, molhos ou geleias.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo a separação dos compostos bioativos do cálice do hibisco por micro-ondas e seu encapsulamento com polidextrose e proteína isolada do soro de leite por atomização e liofilização.

Este trabalho encontra-se organizado da seguinte forma: no Capítulo 1 está apresentada a revisão bibliográfica abordando os principais pontos do tema proposto. Os Capítulos 2 e 3 estão na forma de artigos científicos, os quais descrevem as justificativas, as metodologias empregadas durante a condução dos experimentos, os resultados obtidos e a discussão. O Capítulo 4 é constituído das considerações finais, que compreende uma discussão geral do trabalho e perspectivas de trabalhos futuros.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Extrair compostos bioativos a partir do cálice do hibisco usando água acidificada com extração assistida por micro-ondas e a microencapsulação do extrato mediante atomização e liofilização.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar três métodos de separação dos compostos bioativos do extrato aquoso acidificado do cálice do hibisco através de (i) extração assistida por micro-ondas (EAM), (ii) extração aquosa seguida de EAM e (iii) EAM seguida de extração aquosa;
- Quantificar por cromatografia líquida de alta eficiência os compostos extraídos na EAM e extração exaustiva com solvente orgânico;
- Realizar a microencapsulação do melhor extrato de hibisco obtido pelo melhor tratamento do primeiro método de extração através de atomização e liofilização empregando povidona e a proteína isolada do soro de leite como materiais de parede;
- Avaliar as características físico-químicas e estruturais das micropartículas obtidas, e a estabilidade dos compostos encapsulados em condições aceleradas de armazenamento.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Hibisco

O hibisco é uma espécie vegetal da família Malvaceae, proveniente da África Oriental e foi introduzido no Brasil no final do século XIX pelos africanos (Panizza, 1997). *Hibiscus sabdariffa* L. é conhecido popularmente como hibisco, hibiscus, roselia, groselha, azedinha, quiabo azedo, caruru-azedo, caruru-da-guiné e quiabo-de-angola (Martins, 1990). Trata-se de uma planta adaptada ao clima quente, desenvolvendo-se em temperaturas na faixa de 18 a 35°C, sendo cultivada em uma ampla faixa de condições ambientais (Morton, 1987; Freitas et al., 2013).

Arbusto de ciclo anual, o hibisco pode atingir mais de 1,80 m de altura, pouco ramificado e com a forma de taça de tonalidade vermelha (Maciel et al., 2012), chegando a produzir até 500 kg de cálices vermelhos comestíveis por hectare (Cissé et al., 2009). Esta planta é cultivada em jardins e hortas caseiras, usada para fins ornamentais, confecção de geleias, doces, sucos, xaropes, gelatinas, vinho, vinagre, molhos ou ser consumidos in natura (Aurelio et al., 2008; Jung e Joo, 2013).

Os cálices (Figura 1) são a parte mais estudada do hibisco, pois apresentam coloração vermelha e sabor azedo, atraindo a atenção das indústrias de alimentos e farmacêuticas, as quais vislumbram a possibilidade de exploração racional desse vegetal como matéria-prima para elaboração de alimentos e como fonte natural de corantes devido as antocianinas presentes na sua composição, demonstrando assim um grande potencial econômico (Vizzotto e Pereira, 2010). As antocianinas mais frequentemente encontradas são cianidina-3-glucosídeo, delphinidina-3-glucosídeo, cianidina-3-sambubiosídeo e delphinidina-3-sambubiosídeo (Rodríguez-Medina et al., 2009).

A corola é composta por cinco sépalas de intensa coloração vermelha em forma de cone, que forma o cálice. Na base do cálice, está o calículo ou o pequeno cálice disposto em círculo. A cápsula é o fruto que possui aspecto aveludado e cerca de 2 cm de comprimento, abrigando as sementes (Castro et al., 2004; Maciel et al., 2012). As sementes possuem maior capacidade antioxidante, possivelmente devido à presença de fitoesteróis e tocoferóis, particularmente β -sitosterol e α -tocoferol (Mohamed et al., 2007). As sementes e os cálices contem atividade antioxidante maior do que as folhas e os caules, sendo que os cálices contêm

uma alta concentração de antocianinas (Tsai et al., 2002; Sayago-Ayerdi et al., 2007; Juliani et al., 2009).



Figura 1. Partes estruturais do hibisco.

O interesse nessa planta cresce devido aos extratos de hibisco apresentarem elevada quantidade de compostos fenólicos, como antocianinas, ácidos orgânicos, esteróides, terpenóides, polissacarídeos (Sayago-Ayerdi et al, 2007; Ramos et al., 2011; Gibis et al., 2014; Kalla et al., 2015), além de alto teor de vitamina C, β -caroteno, licopeno e outros antioxidantes solúveis em água (Duke e Atchley, 1984; Wong et al., 2002).

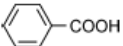
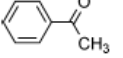
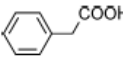
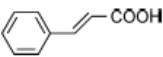
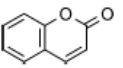
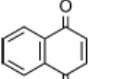
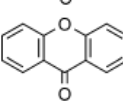
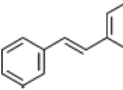
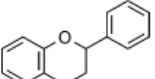
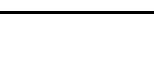
Ensaio farmacológicos com o hibisco têm demonstrado uma gama de efeitos terapêuticos, como hepatoprotetor, antibacteriano, antioxidante, anticolesterol, anti-hipertensivo (Herrera-Arellano et al., 2007; Patel, 2014; Zhen et al., 2016), além de ser reconhecido na medicina tradicional para o tratamento de hipertensão, inflamação e doenças do fígado (Lans, 2006; Lin et al., 2007; McKay et al., 2010).

2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos na natureza, sendo que mais de 8000 destes já foram identificados em plantas (Brand-Williams et al., 1995; Silva et al., 2010). Os fenóis são definidos como substâncias que englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (Bravo, 1998), possuindo um anel aromático com uma cadeia carbônica (Lee et al., 2005). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas, ou seja, possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais, sendo chamados de polifenóis (Naczek e Shahidi, 2004). Os fenóis podem ser classificados em flavonoides, subdividido em seis subclasses: flavonóis, flavonas, flavan-3-óis, flavononas, isoflavonoides e antocianidinas; e não-flavonoides, dentre eles os ácidos fenólicos, os estilbenos, as cumarinas e os taninos (Fraga, 2009).

As várias classificações pelo número e disposição dos seus átomos de carbono são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Esqueletos estruturais básicos de compostos fenólicos.

Classificação	Esqueleto	Estrutura básica
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁	
Acetofenonas	C ₆ -C ₂	
Ácido fenilacético	C ₆ -C ₂	 
Ácidos hidroxicinâmicos	C ₆ -C ₃	
Cumarina	C ₆ -C ₃	
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄	
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆	
Estilbeno	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Flavonóides	C ₆ -C ₃ -C ₆	

Fonte: Crozier et al., 2009.

Os compostos fenólicos podem ser pigmentos ou produtos originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, formando-se em condições de estresse, como infecções, ferimentos, exposição a radiações UV e outras agressões do ambiente (Naczki e Shahidi, 2004).

Os compostos fenólicos agem como antioxidantes, pois são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, apresentando eficiência na prevenção da auto-oxidação (Shahidi et al., 1992), com habilidade em doar hidrogênio ou elétrons (Brand-Williams et al., 1995). Ainda incluídos em seus benefícios, a atividade anticarcinogênica desses compostos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele (Angelo e Jorge, 2007; Ignat et al., 2011).

2.1 Antocianinas

As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonóides, compostos fenólicos caracterizados pelo núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio) que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensada por um oxigênio (Fay e Kussmann, 2010). A molécula de antocianina é constituída por uma aglicona

(antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos (Francis, 2000; Monteiro et al., 2005). Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, das quais 18 ocorrem naturalmente e apenas seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes em alimentos sendo responsáveis pelas cores vermelha, roxa e azul (Lee et al., 2005).

Segundo Heredia et al. (1998), em solução aquosa encontram-se na forma de misturas de diferentes estruturas em equilíbrio: cátion flavilium (vermelho), base anidra quinoidal (azul), chalcona (incolor ou levemente amarela) e pseudo-base carbitol (incolor). Nas plantas, o pH das células torna as antocianinas estáveis (Betz et al., 2012); a pH abaixo de 2, as antocianinas apresentam-se basicamente na forma catiônica e com o aumento do pH, ocorre uma rápida desprotonação para formar a base quinoidal (Heredia et al., 1998). A coloração das antocianinas é diretamente influenciada pelo aumento dos grupos hidroxila, tornando a cor azulada, e metoxila, aumentando a intensidade do vermelho, na molécula (Delgado-Vargas et al., 2000).

As antocianinas são responsáveis pela maioria das cores que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (Markakis, 1982; Vinson et al., 1999). Estes compostos são solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas (Ma et al., 2012).

A cor de uma antocianina varia desde o vermelho (condição ácida) até o azul ou amarelo (condição alcalina), variação esta que ocorre quando o íon hidrogênio é adicionado ou removido da molécula (Vinson et al., 1999). A coloração final, apresentada pelo tecido vegetal, depende de outros fatores, como luminosidade, concentração da antocianina dissolvida, presença de íons, açúcares e hormônios (Peleg et al., 1998).

As diferentes funções apresentadas pelas antocianinas encontram-se diretamente relacionadas com sua diversidade estrutural (Bordignon et al., 2009). Suas moléculas possuem estruturas elaboradas, e são baseadas em um esqueleto policíclico de quinze carbonos, onde os diferentes grupos ligados, "R", caracterizam cada composto de antociânico, mostrado a Figura 2.

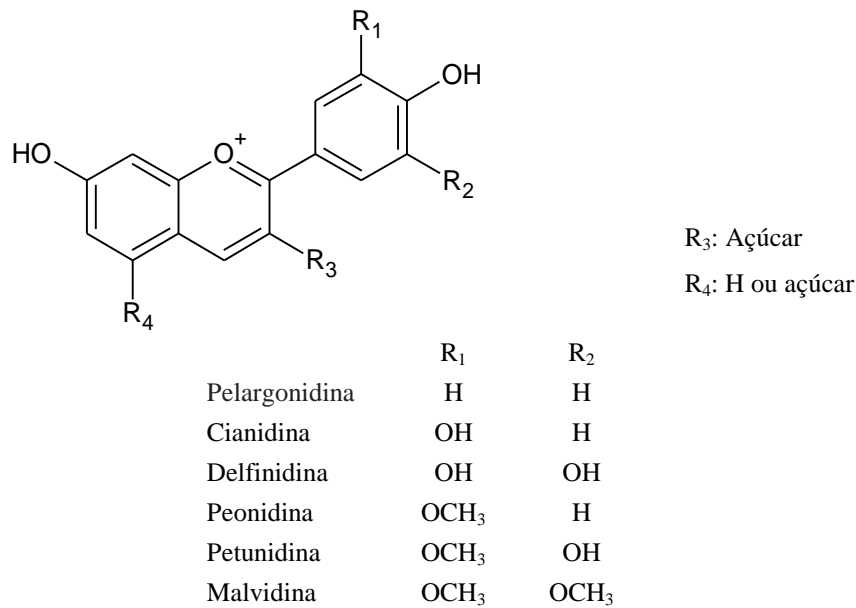


Figura 2. Estrutura química básica das antocianinas.

Fonte: Delgado-Vargas et al., 2000.

Entre as muitas funções que possuem estão a atração de polinizadores na produção de sementes, proteção contra danos provocados pela luz UV na folha, atuando como filtro e melhorando e regulando a fotossíntese, e ainda segundo Mazza e Miniati (1993) e Suppadit et al. (2011) devido a sua diversidade de cores, as torna materiais potenciais no uso como indicadoras de pH.

As antocianinas também apresentam grande importância na dieta humana e podem ser consideradas como uma importante aliada na prevenção/retardamento de doenças cardiovasculares, do câncer e doenças neurodegenerativas, devido ao seu poder antioxidante, atuando contra os radicais livres, apresentando propriedades farmacológicas sendo utilizadas para fins terapêuticos (Tseng et al., 1997; Farombi e Ige, 2007).

3 Atividade antioxidante

Compostos antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou impedir danos devido à oxidação, estando presentes em pequenas concentrações, quando comparados com o agente oxidante (Maisuthisakul et al., 2007). Estes compostos podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde (Rice-Evans et al., 1996).

Na classe sintética, estão incluídos o BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butilhidroxitolueno) e terc butil hidroquinona (TBHQ), comumente utilizados em alimentos contendo lipídios, porém apresentam problemas de segurança e toxicidade (Rice-Evans et al., 1996). Sendo assim, as pesquisas tem se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com potencial ação antioxidante que possam substituí-los ou ser usados em associação (Burda e Oleszek, 2001).

Muitos dos compostos antioxidantes da classe natural são de origem vegetal e pertencem à classe fenólica e polifenólica de compostos, bem como os carotenóides e vitaminas antioxidantes, dentre outros (Podsdek, 2007).

As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetoras e agir em diversas etapas do processo oxidativo celular, funcionando por diferentes mecanismos e são, portanto, classificadas em duas categorias principais: antioxidantes primários e secundários. São considerados primários os compostos de ação antioxidante capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres graças à doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, o que transforma os radicais em substâncias estáveis (Maisuthisakul et al., 2007; Bubonja-Sonje et al., 2011). Ainda segundo estes autores, os antioxidantes secundários apresentam uma grande variedade de modos de ação: ligação de íons metálicos (alteração de valência); inativação de ERO (espécies reativas do oxigênio), conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou absorção de radiação UV.

Os antioxidantes possuem efeito sobre os radicais livres, cuja produção ocorre naturalmente durante ações catalíticas de enzimas, no metabolismo celular ou pela exposição à fatores exógenos (Barreiros et al., 2006; Bianchi e Antunes, 1999) e outros agentes oxidantes no organismo (Ramos et al., 2011). Estes radicais livres são moléculas instáveis e reativas, que são precursoras de muitas doenças crônicas não transmissíveis associadas ao envelhecimento, doenças carcinogênicas, doenças cardiovasculares, cataratas, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (Ames et al., 1993; Ramos et al., 2011).

Os mecanismos pelos quais essas patologias se desenvolvem, geralmente envolvem alterações oxidativas de moléculas consideradas críticas, o que inclui proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos além das substâncias envolvidas na modulação da expressão gênica e em respostas inflamatórias (Kawanishi et al., 2002; Laguerre et al., 2007), assim sendo, a capacidade antioxidante protege moléculas como o DNA, podendo vir a reverter alguns processos carcinogênicos (Lazzé et al., 2003).

4 Processos de extração

Os compostos bioativos de materiais vegetais podem ser extraídos por técnicas clássicas de extração. A maioria dessas técnicas é baseada no poder de extração de diferentes solventes utilizados (metanol, etanol, propanol, acetona, acetato de etila, e suas combinações, com diferentes proporções de água) e a aplicação de calor e/ou maceração (Azmir et al., 2013).

Esses procedimentos costumam ser longos, com temperaturas de até 80°C, exposição à luz e ao oxigênio, podendo ocasionar degradações, comprometendo a qualidade e o rendimento do extrato final, além do potencial para poluição ambiental devido ao grande volume de solventes utilizados (Garcia-Salas et al., 2010; Aspé e Fernández, 2011).

Devido a estas desvantagens, os tradicionais métodos de extração têm sido substituídos por outras metodologias que são mais sensíveis, seletivas, rápidas e ambientalmente seguras (Oliveira, 2014). Algumas dessas novas técnicas são consideradas técnicas limpas, por serem menos poluidoras do que as técnicas convencionais, além de terem maior eficiência energética e reduzir o tempo de análise (Sun et al., 2012).

A extração assistida por micro-ondas, ultrassom, e a utilização de fluidos comprimidos, como a extração por água subcrítica e pelo CO₂ supercrítico, tem sido aplicadas na obtenção de compostos fenólicos, sendo mais sensíveis, seletivas e rápidas (Yang et al., 2013).

4.1 Micro-ondas

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas com componentes de campo elétrico e magnético. A irradiação de micro-ondas trabalha na faixa de frequência de 300 MHz a 300 GHz e comprimentos de onda variando entre 10⁶ a 10⁹ Å (Larhed et al., 2002; Kappe et al., 2009).

Os princípios envolvidos no aquecimento por micro-ondas fazem referência a alguns conceitos físicos e químicos, tais como temperatura, ligação química, estrutura molecular, momento de dipolo, polarização, capacidade calorífica e constante dielétrica (Rosini et al., 2004).

O aquecimento de um material com a irradiação de micro-ondas se dá devido à interação da onda eletromagnética com o dipolo elétrico da molécula. Um importante atributo do aquecimento por micro-ondas é a absorção direta da energia pelo material a ser aquecido (Rosini et al., 2004), ao contrário do que ocorre quando o aquecimento é realizado por

convecção, no qual a energia é transferida lentamente de fora para dentro (Barboza et al., 2001).

O aquecimento promovido pela irradiação de micro-ondas pode ser obtido basicamente por dois mecanismos: polarização dipolar e condução iônica. Desta maneira, quando o alimento é irradiado com micro-ondas, os dipolos e/ou os íons presentes nele alinham-se ao campo elétrico aplicado. Como o campo elétrico oscila, os dipolos e/ou os íons tendem a se realinhar ao campo elétrico oscilante e neste processo dissipam energia sob a forma de calor, devido aos choques moleculares e perdas dielétricas (Souza e Miranda, 2011).

O elevado conteúdo de água nos alimentos faz com que a dissipação de energia seja alta, isto é, como a direção do campo muda constantemente, as moléculas de água, que apresentam momento de dipolo elétrico, permanente ou induzido, sofrem um alinhamento parcial e, com a posterior reversão da direção do campo, as moléculas sofrem um realinhamento (Madej, 2009). O alinhamento e realinhamento das moléculas, com elevada frequência, produzem grande quantidade de calor devido ao atrito produzido (Sanseverino, 2002).

O mecanismo por condução iônica envolve a perda dielétrica por atrito, que ocorre através da migração de íons dissolvidos sob a ação de um campo eletromagnético. Esta perda depende do tamanho, da carga, da condutividade dos íons dissolvidos e interação destes com o solvente empregado (Souza e Miranda, 2011; Tsukui e Rezende, 2014).

Quando submetidos à irradiação por micro-ondas a separação dos compostos de interesse ocorre como o resultado de alterações na estrutura da célula causadas por ondas eletromagnéticas que agem sobre o meio aquoso (Veggi et al., 2015). Ainda com o uso das micro-ondas, ocasiona altas taxas de separação e um alto rendimento de extração, podendo ser o resultado de uma combinação sinérgica de dois fenômenos de transporte, ou seja, transferência de calor e massa agindo na mesma direção (Chemat e Esveld, 2001), enquanto que nas extrações convencionais a transferência de massa ocorre do interior para o exterior do substrato, e a transferência de calor ocorre do exterior para o interior (Wu et al., 2012). Além disso, na extração convencional o calor é transferido de um fluido quente para o interior da amostra, já na extração por micro-ondas, o calor é dissipado volumetricamente no interior do meio irradiado (Veggi et al., 2015; Wu et al., 2012).

5 Microencapsulação

A encapsulação é um processo de empacotamento de partículas em cápsulas comestíveis. A imiscibilidade entre o composto ativo e a solução/suspensão do agente

encapsulante é o que permite a formação inicial das cápsulas, pois a homogeneização dessa mistura gera uma emulsão na qual a fase contínua é composta do solvente com o agente encapsulante e a fase descontínua é o composto ativo (Singh et al., 2010; Munin e Edwards-Lévy, 2011).

As cápsulas formadas podem ser divididas em dois grupos: o primeiro, sistema do tipo reservatório, caracteriza as verdadeiras microcápsulas, aquelas nas quais o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede; o segundo, sistema matricial, resulta nas chamadas microesferas, aquelas nas quais o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz (Ré, 1998).

As partículas podem ser classificadas por tamanho em três categorias: macro para tamanhos maiores que 5000 μm , micro para tamanhos de 0,2 a 5000 μm e nanopartículas para tamanhos menores a 0,2 μm (King, 1995; Ré, 1998; Azeredo, 2005).

Dentre os objetivos da encapsulação de componentes de alimentos estão reduzir as interações dos componentes encapsulados com fatores ambientais, retardar alterações que podem resultar em perda de aroma, alteração de cor ou perda do valor nutricional e/ou funcionalidade, separar componentes reativos ou incompatíveis, mascarar compostos de sabor indesejável, promover melhor solubilidade dos componentes e melhor incorporação em sistemas secos (Shahidi e Han, 1993; Leimann et al., 2009; Murúa-Pagola et al., 2009; Costa et al., 2012; Nesterenko et al., 2013).

Outro importante objetivo é permitir que a liberação do material encapsulado ocorra lentamente com o tempo ou a partir da ocorrência de um certo evento. Esse conceito, denominado liberação controlada, pode referir-se ao controle do início da liberação ou da taxa de liberação (Risch, 1995). Esta pode ser desencadeada por cisalhamento, solubilização, aquecimento, pH ou ação de enzimas (Nesterenko et al., 2013).

A encapsulação de moléculas pode ser obtida mediante vários processos, que estão subdivididos em métodos físicos, químicos e físico-químicos. Entre os métodos físicos, destacam-se o spray-drying, spray-cooling, spray-chilling, leiteo fluidizado, extrusão, co-cristalização e a liofilização; entre os métodos químicos listam-se a inclusão molecular e a polimerização interfacial; nos métodos físico-químicos encontram-se a coacervação simples ou complexa, separação por fase orgânica e emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (Shahidi e Han, 1993; Gibbs et al., 1999; Santos et al., 2000; Favaro-Trindade et al., 2008).

A escolha do método de encapsulação para uma aplicação específica depende de uma série de fatores, dentre eles o tamanho de partículas requerido, propriedades físicas e químicas

do núcleo e da parede, aplicação do produto final, mecanismos desejados de liberação e custos (Ré, 1998). De acordo com Silva et al. (2003) e Azeredo (2005), o método de encapsulação deve ser simples, reprodutível, rápido e fácil de transpor à escala industrial.

5.1 Atomização (*spray drying*)

O método de encapsulação por atomização ou *spray-drying* é o mais comumente utilizado na indústria para microencapsulação de alimentos (Murúa-Pagola et al., 2009; Ahmed et al., 2010), principalmente pelas inúmeras vantagens que apresenta, como o baixo custo de produção, as variedades de materiais encapsulantes, a boa retenção de compostos voláteis, a boa estabilidade dos encapsulados e a produção em larga escala em modo contínuo (Reineccius, 1988; Desobry e Debeaufort, 2011).

Os parâmetros de atomização influenciam importantes propriedades dos pós como densidade, formato, distribuição de tamanho, quantidade de ar ocluso e o teor final de umidade (Silveira et al., 2013), isto é, as funções básicas da atomização proporcionam uma elevada taxa de evaporação e produzem partículas com formato, tamanho e densidade com magnitudes controladas e desejadas (Schuck et al., 2012).

As partículas encapsuladas produzidas por atomização são geralmente do tipo matricial, com o núcleo distribuído na forma de micropartículas na matriz seca do material encapsulante, sendo que os mecanismos de liberação dos compostos de interesse geralmente associados à atomização são pela ação de solventes e por difusão (Ré, 1998).

De acordo com Soottitantawat et al. (2005), Schuck et al. (2010) e Silva et al. (2016), no processo de encapsulação por atomização, a substância a encapsular é homogeneamente dispersa ou dissolvida em uma solução aquosa ou dispersão que contém o agente encapsulante e a dispersão é bombeada através do atomizador, em forma de névoa de gotículas (*spray*) para dentro de uma corrente de ar quente na câmara de secagem. Devido à grande diferença de temperatura e de concentração, ocorre um processo simultâneo de transferência de calor e massa, retirando material volátil das gotas, com conseqüente solidificação das gotículas que são recolhidas no ciclone ou em outro sistema de coleta de pó. Santana et al. (2013) ressaltam ainda que o tempo de contato utilizado no processo, por ser curto (de 1 a 10 s), favorece a mínima deterioração do produto, mesmo a altas temperaturas (170 a 220 °C).

5.2 Liofilização

A encapsulação pode ser realizada por meio de liofilização de uma emulsão, gerando produtos de excelente qualidade, uma vez que minimiza as alterações associadas a altas

temperaturas (Azeredo, 2005). A perda de água durante a secagem por liofilização protege a estrutura primária e minimiza mudanças na forma do produto, contribuindo para preservar componentes como os pigmentos naturais (George e Datta, 2002; George et al., 2011; Oliveira et al., 2012).

A liofilização ou *freeze-drying* consiste na secagem/desidratação de um produto previamente congelado, geralmente, este solvente é a água (Polak e Pitombo, 2011), onde o solvente, no estado sólido, passa diretamente ao estado gasoso, por sublimação. O passo prévio à liofilização é o congelamento dos alimentos, que deve ser rápido, a fim de transformar as soluções aquosas dos alimentos em uma mistura de duas fases sendo uma constituída por pequenos cristais de gelo, que visa reduzir os danos à estrutura celular do alimento, e a outra pela solução concentrada dos solutos (Fellows, 1988; Ordóñez, 2005).

Ao longo da secagem por liofilização distinguem-se duas etapas: desidratação primária, ocorrendo a maior remoção do conteúdo de água por sublimação e desidratação secundária, ou dessorção, que retira uma quantia de água ligada que ocorre sob vácuo, onde com uma pressão menor, fica mais fácil as moléculas de água atingirem uma energia cinética que permita que elas vençam essa pressão externa que está sobre sua superfície e passem para o estado de vapor mediante à adição de calor (condução, convecção ou radiação) (Fellows, 1988; Neves et al., 2002).

Este método preserva melhor a qualidade do produto (Boss, 2004), aumentando a estabilidade do mesmo durante a estocagem, além que o material poderá ser armazenado e transportado à temperatura ambiente (Fellows, 1988).

O produto liofilizado possui uma textura porosa, sendo prontamente reconstituído (Ratti, 2001). As partículas obtidas através da técnica de liofilização apresentam geralmente formatos irregulares, modificando a morfologia original dos materiais de revestimento, deixando mais semelhante a serragem, diferentemente de outras técnicas (Ballesteros et al., 2017).

6 Material de parede

O material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as micropartículas (Singh et al., 2010). Características físico-químicas como solubilidade, massa molar, transição vítrea, cristalinidade, formação de filme e difusividade, são parâmetros importantes na escolha de um polímero de parede desejado (Aghbashlo et al., 2012). As características da emulsão, tais como a estabilidade, a viscosidade, o tamanho das gotas e as características do

pó, são principalmente afetadas pelo tipo de agente transportador (Jafari et al., 2008) e a capsula formada deve apresentar algumas propriedades, como flexibilidade, resistência, impermeabilidade e estabilidade (Venkatesan et al., 2009).

De acordo com Santos et al. (2000) e Suave et al. (2006), o encapsulante ideal deve apresentar as seguintes propriedades: baixa viscosidade em concentrações elevadas e de fácil manipulação durante o processo; baixa higroscopicidade para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; não ser reativo com o material a ser encapsulado; ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da partícula; liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; ser solúvel em solventes comumente usados; possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo; não apresentar sabor desagradável no caso de consumo oral e ser econômico.

Segundo Shahidi e Han (1993), os materiais mais utilizados como encapsulantes compreendem os carboidratos (amidos, dextrinas, xarope de milho, sacarose), celuloses (carboximetilcelulose, etil, metil, acetil e nitro-celulose), gomas (arábica, guar, alginato de sódio, carragena), lipídeos (cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, mono e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas) e proteínas (glúten, caseína, isolado protéico de soro de leite, gelatina, albumina e quitosana). Os agentes de encapsulação podem ser utilizados sozinhos ou em combinação e a composição ideal é definida para cada processo de microencapsulação particular (Fernandes et al., 2012).

6.1 Proteína isolada do soro de leite (WPI)

As proteínas isoladas do soro de leite (*whey protein isolate*, WPI, da sigla em inglês) apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que conferem certo grau de estabilidade estrutural (Haraguchi et al., 2006). Apresentam também a capacidade de desnaturar, dissociar e agregar em diferentes condições de pH, força iônica e temperatura para formar partículas com tamanho variando de 40 nm a 2 μ m, propriedades estas que podem ser exploradas para formular partículas carregadas de moléculas ativadas com tamanho específico (Chen et al., 2006).

As frações, ou peptídeos do soro, são constituídas de β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e glicomacropéptídeos, essas frações podem variar em tamanho, massa molar e função, fornecendo às proteínas do soro características especiais (Kinsella e Whitehead, 1989; Aimitis, 2004).

As proteínas possuem propriedades funcionais únicas, incluindo sua capacidade de formar géis e emulsões, o que lhes permite ser um material ideal para o encapsulamento de compostos bioativos (Chen et al., 2006). Os géis formados podem ser usados como hidrogéis sensíveis ao pH para a libertação controlada de substâncias biologicamente ativas (Gunasekaran et al., 2006).

Os géis de proteína do soro apresentam ainda como vantagem a total biodegradabilidade e de não ter necessidade de agentes químicos de reticulação na sua preparação, sendo estes, os dois mais importantes requisitos para ampla utilização de hidrogéis em muitas aplicações alimentares e de bioprocessamento (Gunasekaran et al., 2007).

6.2 Polidextrose (PD)

A polidextrose é um polímero de moléculas de glicose unidas por ligações α -1,6, que contém como grupo terminal o sorbitol e/ou ligações monoésteres de ácido cítrico, composta de dextrose, sorbitol e ácido cítrico na proporção 89:10:1 (Cândido e Campos, 1996). Possui grau de polimerização médio de 12 e massa molecular em torno de 2000 Da (Flood et al., 2004).

As soluções de polidextrose têm uma viscosidade maior que as soluções de sacarose ou sorbitol em concentrações e temperaturas equivalentes, além de ser altamente solúvel em água (Raninem et al., 2011). Estas características permitem que a polidextrose ofereça características desejáveis quando se substituem açúcares e gorduras (Roller e Jones, 1996).

A polidextrose confere corpo, textura e atribui características funcionais semelhantes às da sacarose, além de possuir alta higroscopicidade, com coloração creme e não conferir sabor e odor aos alimentos (Bunting, 1994). Uma grande vantagem apresentada pela polidextrose é seu baixo valor calórico, sendo $\frac{1}{4}$ do valor da sacarose (Burdock e Flamm, 1999), de aproximadamente 1 kcal / g ou 4,2 kJ / g, que se deve à molécula ser grande, complexa e ramificada ao acaso, não sendo possível a sua quebra por enzimas digestivas, sendo assim seu metabolismo ocorre apenas por bactérias do intestino (Moppet, 1991) e tem efeitos prebióticos (Probert et al., 2004).

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE CÁLICE DE HIBISCO (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.) MEDIANTE A EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

CAPÍTULO 3

ESTUDO DO ENCAPSULAMENTO DO EXTRATO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO HIBISCO (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.) UTILIZANDO POLIDEXTROSE E PROTEÍNA ISOLADA DO SORO DE LEITE

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL

Três procedimentos de extração assistida por micro-ondas (EAM) foram estudados para obter compostos bioativos a partir do cálice do hibisco. O primeiro consistiu na extração usando somente separação por micro-ondas, avaliando-se as potências de 200, 300 e 700 W e os tempos de 2, 5 e 8 min. A ebulição, em maiores potências e tempos testados, foi a condição limitante para a técnica empregada. Nessa etapa a extração a 700 W e 8 min apresentou os melhores resultados, conforme na Tabela 1. O uso de maior potência proporcionou extrações mais efetivas, separando maior quantidade de compostos, que pode compensar as possíveis perdas por degradação térmica e degradação pelos maiores tempos de residência. Maiores temperaturas durante o EAM aumentam os coeficientes cinéticos de difusão e reduzem a resistência convectiva à transferência de massa, ajudando os compostos a difundir-se mais rapidamente através do solvente e das células (Latha, 2007).

Tabela 1. Teores de antocianinas monoméricas totais (TMA), compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante por ABTS dos extratos dos cálices de hibisco obtidos nos três diferentes tratamentos de extração.

Tratamento	TMA*	TPC**	ABTS***
I	1,15 ^B	23,54 ^C	93,01 ^B
II	1,58 ^A	26,9 ^B	142,15 ^A
III	1,63 ^A	29,62 ^A	133,25 ^A

Diferentes letras dentro da mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). *Resultados expressos em $\text{mg}_{\text{delfinidina-3-sambubiosideo}} \cdot \text{g}^{-1}$ de amostra em base seca, ** $\text{mg}_{\text{EAG}} \cdot \text{g}^{-1}$ de amostra em base seca, *** $\mu\text{mol}_{\text{ET}} \cdot \text{g}^{-1}$ de amostra em base seca. I: EAM a 700 W e 8 min; II: 6 h de extração aquosa ácida, seguida de EAM a 700 W por 8 min; III: EAM a 700 W por 8 min seguida de 6 h de extração aquosa ácida.

No segundo método, previamente foi realizada uma extração aquosa ácida em tempos de 1, 2, 4, 6, 18 e 24 horas, à temperatura ambiente. Após cada tempo a mistura foi filtrada e o retido foi novamente imerso numa nova solução acidificada e imediatamente colocada no forno de micro-ondas, empregando potências de 200, 300 e 700 W, e tempos de 2, 5 e 8 minutos, respectivamente. Crossley e Aguilera (2001) relatam que a vantagem da prévia extração aquosa ácida é que as moléculas do solvente, a temperatura ambiente, penetram na matriz da planta progressivamente, facilitando a dissolução de compostos

ativos. Posteriormente o uso da maior potência gerou maior rotação das moléculas de água do solvente, gerando maior calor com o conseguinte aumento da temperatura, incrementando a difusão do solvente. A melhor extração foi aquela com 6 h, 700 W e 8 min (Figuras 2C, 3C e 4C, Capítulo 2), pois diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas e maiores teores dos compostos estudados, com concentração de antocianinas, fenólicos totais e atividade antioxidante mostrados na Tabela 1.

No terceiro método, foi primeiramente realizada a EAM e após filtração, o retido foi submetido a extração aquosa ácida a temperatura ambiente. Os fatores e níveis empregados em cada extração foram os mesmos usados no segundo método. O melhor comportamento foi a EAM a 700 W por 8 min, seguida de 6 horas de extração aquosa ácida, com teores expostos na Tabela 1. Cabe ressaltar que nos extratos provenientes de 700 W, devido as maiores temperaturas atingidas, que geralmente são melhores para extração devido ao aumento de solubilidade e devido a possível destruição da parede celular, resulta em mais compostos liberados (Zhang et al., 2013). Dessa forma, as concentrações de compostos provenientes da extração aquosa após a EAM de 700 W foram significativamente menores do que nas potências de 200 e 300 W (Figuras 5C, 6C, e 7C, Capítulo 2).

Quando os três métodos foram comparados, a melhor condição de extração foi aquela obtida no terceiro método, com EAM a 700 W por 8 min seguida de 6 horas de extração aquosa ácida ($1,63 \text{ mg}_{\text{delfinidina-3-sambubiosídeo}} \cdot \text{g}^{-1}$; $29,62 \text{ mg}_{\text{EAG}} \cdot \text{g}^{-1}$; $133,25 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{ET}} \cdot \text{g}^{-1}$) para antocianinas, fenólicos totais e atividade antioxidante por ABTS, respectivamente.

Foi realizada uma comparação da extração exaustiva com metanol acidificado e do melhor tratamento obtido utilizando somente EAM, no primeiro método (700 W e 8 min), dos cálices de hibisco. A atividade antioxidante foi significativamente maior nesta última, menor para o teor de fenóis ($p < 0,05$), enquanto que para o teor de antocianinas não houve diferenças significativas. Esse resultado pode ser explicado devido aos compostos fenólicos, extraídos em maior quantidade na extração exaustiva, poderem apresentar menor poder antioxidante do que aqueles compostos obtidos na EAM. A EAM foi bastante vantajosa, pois forneceu rendimentos de extração comparáveis com a extração exaustiva, além de requerer menor tempo de extração, devido as micro-ondas romperem a estrutura da planta para aumentar o poder de extração (Mandal et al., 2007).

Na comparação desse melhor tratamento obtido no primeiro método (700 W e 8 min com a extração exaustiva por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, quantificou-se os compostos presentes (Tabela 2, Capítulo 2). Foram encontrados 13 compostos, sendo 6 ácidos fenólicos, 2 antocianinas e 5 flavonóides derivados da quercetina, kaempferol e miricetina. O total de

compostos fenólicos quantificados foi de $7,27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ massa seca para extração exaustiva e $3,52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ massa seca para EAM, esses valores foram inferiores àqueles encontrados em análise espectrofotométrica, de $42,95$ e $23,54 \text{ mg}_{\text{EAG}} \cdot \text{g}^{-1}$ de amostra seca para extração exaustiva e EAM, respectivamente. A grande variação desses valores se deve a superestimação do conteúdo fenólico pelo método de Folin-Ciocalteu, em virtude de que o reagente adicionado também pode reagir com compostos não fenólicos, tais como ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos e reagir com moléculas facilmente oxidáveis (Angelo e Jorge, 2007). Os resultados obtidos pela reação de Folin-Ciocalteu podem fornecer uma indicação geral das propriedades antioxidantes, maximizada, fornecendo o índice de polifenóis totais (Blasco et al., 2005), enquanto a quantificação por HPLC foi realizada apenas nos compostos identificados na Tabela S1 (Capítulo 2), isto é, compostos fenólicos minoritários não foram quantificados.

A extração exaustiva foi realizada em 25 min a temperatura ambiente, e após passou por uma etapa de retirada de solvente a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, enquanto a EAM em 8 min atingiu temperatura em torno de $96 \text{ }^\circ\text{C}$. A EAM apresentou um tempo 3 vezes menor de extração do que a extração exaustiva. A recuperação dos compostos obtidos na exaustiva foi 50 % maior, entretanto, devido a redução no tempo e extração dos mesmos compostos obtidos, verificados na Tabela S1 (Capítulo 2), a EAM tem alto potencial extrativo se acompanhado de uma extração combinada e/ou o uso em altas temperaturas controladas que não permitam a degradação dos compostos bioativos.

No Capítulo 3, foi apresentado um estudo da elaboração de micropartículas do melhor extrato fenólico aquoso acidificado dos cálices de hibisco (700 W e 8 min) obtidos no primeiro método do Capítulo 2, em que foram produzidos pós encapsulados utilizando o método de atomização (taxa de fluxo volumétrico de alimentação líquida de $0,6 \text{ mL/h}$ e $160 \text{ }^\circ\text{C}$) e liofilização ($-68 \text{ }^\circ\text{C}$ por 54 horas). A concentração de agente encapsulante empregada foi de 10 % (p/v) para polidextrose (PD), proteína isolada do soro de leite (WPI) e a mistura de ambos. Desse modo, foram estudados seis tratamentos: três atomizados e três liofilizados. Polissacarídeos e proteínas são classes importantes de componentes alimentares que podem afetar estrutura, estabilidade e textura dos produtos alimentares devido às suas propriedades funcionais, como espessamento e estabilização da superfície (Tolstoguzov, 1991). A polidextrose conferirem corpo, textura e atribui características funcionais semelhantes às da sacarose, e não confere sabor e odor aos alimentos (Bunting, 1994). As proteínas do soro de leite possuem capacidade de formar géis e emulsões, o que lhes permite ser um material ideal para o encapsulamento de compostos bioativos (Chen et al., 2006).

Primeiramente foram realizadas análises físico-químicas (Tabela 1, Capítulo 3), em que todos os pós apresentaram valores baixos (0,11 a 0,26) para atividade de água (a_w), conferindo boa estabilidade. O teor de umidade dos pós variou de 3,4 a 6,7 %, e as maiores umidades corresponderam as amostras contendo polidextrose, sendo significativamente maiores nas amostras liofilizadas. Os valores obtidos para a higroscopicidade, fator importante para a reconstituição e estabilidade dos pós, variaram de 23 a 39 % sendo maior para a amostra liofilizada com somente PD (T4). A solubilidade, que descreve a viabilidade do pó a ser dissolvido na água, foi alta para todos os pós, ficando acima de 86 %, entretanto as amostras com PD apresentaram os maiores valores, independente do tipo de secagem, ressaltando a menor solubilidade da WPI, devido a desnaturação proteica progressiva, havendo maior tendência de agregação da proteína com a consequente diminuição da solubilidade (Lupano, 2000).

As eficiências de encapsulamento, referente ao potencial do material de parede manter o composto de interesse retido dentro da micropartícula, variaram de 42 a 89 %, sendo as maiores eficiências significativas obtidas na amostra liofilizada usando a dispersão de PD, e nas dispersões liofilizadas e atomizadas da mistura de PD com WPI, que corresponderam 86, 89 e 84 %, respectivamente. A eficiência de encapsulação é altamente dependente do material de revestimento utilizado (Rosa et al., 2013). Mahdavi et al. (2016) e Piovesana e Noreña (2018) ressaltam que baixas eficiências de encapsulamento resultam em menor estabilidade dos compostos fenólicos, pois esses podem estar na superfície do pó sem encapsular.

A coloração rósea foi observada em todas as amostras encapsuladas (Figura S1, Capítulo 3). Na análise colorimétrica (Tabela 2, Capítulo 3) os valores do parâmetro L^* maiores nas amostras atomizadas (de 71,18 a 78,87), indicaram amostras mais claras, e esse efeito pode ser devido a descoloração das amostras à degradação das antocianinas (Walkowiak-Tomczak e Czapski, 2007; Duangmal et al., 2008) pelo efeito da temperatura de secagem (Susantikarn e Donlao, 2016). Os valores do parâmetro *Chroma* indicam a saturação de cor de cada amostra, podendo ser observado que as amostras que contém somente PD apresentam valores maiores, com menores perdas de compostos de antocianinas, conclusão também relatada por Piovesana e Noreña (2018), já nas amostras atomizadas WPI confere característica de menor saturação da cor nos pós. A diferença de cor em relação ao cálice do hibisco *in natura* expressada pelo ΔE , mostrou que as amostras liofilizadas apresentaram maior similaridade, sendo a maior com PD e a mistura com WPI, resultados de acordo com a eficiência de encapsulamento.

Para as análises térmicas dos microencapsulados utilizaram-se análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria de varredura diferencial (DSC). Na análise de TGA (Figura 1, Capítulo 3) foi registrada a variação da massa das amostras em função do tempo e da temperatura de 25 a 600 °C. A análise mostrou que nas primeiras etapas de aquecimento, todas as amostras microencapsuladas se comportaram de forma muito similar. O pó atomizado com a WPI foi o que perdeu maior porcentagem de peso nessas etapas. Na última etapa de aquecimento a amostra atomizada com PD foi a que ainda mantinha maior concentração de massa.

Na análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) avaliou-se as possíveis interações entre misturas de polímeros e o extrato (Figura 2, Capítulo 3). Os resultados do FTIR mostram o efeito predominante dos encapsulantes PD e WPI na amostra final, uma vez que essas estruturas não foram afetadas pela adição do extrato de hibisco. Em geral, pode-se observar que o encapsulamento não gerou mudanças consideráveis na frequência dos picos ou intensidade de transmissão, garantindo que o encapsulamento não acontece por incorporação química da estrutura, e sim física (Torkamani et al., 2018) e que a atomização e a liofilização não alteraram a estrutura das matrizes (Ballesteros et al., 2017), pois, independente do processo, não foram observadas alterações expressivas. A microscopia eletrônica de varredura (Figura 3, Capítulo 3) apresentou a estrutura de cada um dos pós em estudo, apresentando grande diferença entre os pós que foram atomizados, com partículas quase esféricas, parede contínua, sem fissuras e poucas concavidades e rugosidades para a amostra contendo apenas povidona e os demais apresentaram formas irregulares, com superfícies enrugadas, livres de rachaduras e poros visíveis e liofilizados com formas de vidro quebrado, de diversos tamanhos, como também foi descrito por Khazaei et al. (2014), consequência do congelamento e da moagem.

O estudo da estabilidade dos pós é importante para a avaliação da viabilidade da utilização desses pigmentos como corantes ou antioxidantes em alimentos (Pitalua et al., 2010). Para esse fim, foram realizados testes de armazenamento em condições aceleradas, utilizando umidades relativas de 75 e 90 % e temperaturas de 40 e 60 °C, para que o experimento pudesse ser realizado em um menor período de tempo, visto que produtos em pó tem uma vida útil longa.

Quanto aos teores de antocianinas nos pós que foram encapsulados, a maior concentração foi registrada no tratamento T4 (liofilizado com 10 % PD) e a menor no tratamento T3 (atomizado com 10 % da mistura PD e WPI), que corresponderam a teores de 0,95 e 0,40 mg_{EAG} · g⁻¹ de amostra em base seca, respectivamente. Esse melhor desempenho

nas amostras liofilizadas pode ter ocorrido pela ausência de exposição à alta temperatura durante a sublimação, visto que a temperatura elevada é o fator que mais afeta a estabilidade das antocianinas (Wang e Xu, 2007). As perdas podem ser consequência da temperatura de secagem e das reações de oxidação, no entanto Tsai e Huang (2004) relataram a possível polimerização das antocianinas durante a secagem, sendo que o protocolo de análises empregado usado somente quantifica antocianinas monoméricas. A completa degradação das antocianinas a 60 °C e 90 % de umidade relativa na segunda semana, quando foram empregadas WPI, mostrou que esse encapsulante não resiste a exposição em condições extremas de estocagem, nem na forma atomizada, nem liofilizada. A maior estabilidade do produto foi encontrada com o emprego de somente a polidextrose como material encapsulante.

Para os compostos fenólicos, avaliados nas duas temperaturas e umidades relativas, foi observada uma queda significativa dos seus teores nas duas primeiras semanas, seguida de não variação de concentração, mostrando a estabilidade desse produto para esse período de tempo, em cada condição de estocagem. A estabilidade dos pós foram maiores com o uso da PD, correspondendo as maiores retenções, 80,9 e 74,9 %, respectivamente, quando encapsuladas por atomização e liofilização. As maiores concentrações de fenóis foram obtidas nos tratamentos liofilizados, indicando que as perdas dos compostos fenólicos ocasionadas na secagem por atomização estão relacionadas às altas temperaturas empregadas (Nesterenko et al., 2013), o que pode causar degradação e polimerização desses compostos (Chang et al., 2006).

Devido a multiplicidade dos sistemas antioxidantes contidos nos sistemas biológicos na matriz de alimentos, diferentes métodos são necessários para analisar diferentes características e mecanismos de reação desses sistemas complexos (Lutz et al., 2011). Neste estudo, três métodos (ABTS, DPPH e HRSA) foram usados para avaliar as propriedades antioxidantes do pó encapsulado do hibisco. Para a atividade antioxidante pode ser observado que quando a medida da atividade antioxidante foi realizada mediante DPPH e HRSA, a polidextrose foi a que melhor se comportou nessas condições de estocagem, com retenções para DPPH de 86 % na liofilização e 82 % na atomização, enquanto para HRSA, foi de 27 e 26 %, respectivamente. Entretanto, quando foi medida a atividade por ABTS, a mistura de PD e WPI foi a que obteve melhores retenções, sendo também maior nas amostras liofilizadas (64,7 %). Dessa forma os resultados indicam a necessidade do uso de embalagens com baixa permeabilidade ao vapor de água e estocados a temperatura ambiente quando for a usar WPI como encapsulante.

Os teores de antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante por ABTS, DPPH e HRSA do extrato aquoso obtido por EAM dos cálices do hibisco foram $1,24 \text{ mg}_{\text{delfinidina-3-sambubiosídeo}} \cdot \text{g}^{-1}$, $23,62 \text{ mg}_{\text{EAG}} \cdot \text{g}^{-1}$, $93,21 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{ET}} \cdot \text{g}^{-1}$, $99,04 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}^{-1}$ e 19,25 %, respectivamente. Logo após encapsulamento, as maiores concentrações de antocianinas ($0,95 \text{ mg}_{\text{delfinidina-3-sambubiosídeo}} \cdot \text{g}^{-1}$), atividade antioxidante por DPPH ($89,04 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{ET}} \cdot \text{g}^{-1}$) e HRSA (14,31 %) foram na amostra T4 (liofilizado, 10 % PD) e fenólicos totais ($21,06 \text{ mg}_{\text{EAG}} \cdot \text{g}^{-1}$) e atividade antioxidante por ABTS ($77,5 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{ET}} \cdot \text{g}^{-1}$) na amostra T6 (liofilizado, 5 % PD e 5 % WPI). Os conteúdos foram significativamente maiores no extrato de hibisco quando comparados com as micropartículas produzidas com diferentes materiais de parede (Tabela 3, Capítulo 3). Durante a estabilidade dos compostos no armazenamento em condições aceleradas, as melhores retenções finais para antocianinas monoméricas totais foram de 53,4 % na amostra liofilizada com PD a 75 % e 40 °C, compostos fenólicos totais de 80,9 % na amostra atomizada com PD a 75 % e 40 °C, atividade antioxidante por ABTS de 68 % na amostra atomizada com WPI a 75 % e 40 °C, atividade antioxidante por DPPH de 86,4 % na amostra liofilizada com PD a 90 % e 40 °C e atividade antioxidante por HRSA de 38,8 % na amostra liofilizada com WPI a 90 % e 60 °C, indicando que no geral, maiores temperaturas afetam mais a estabilidade do que altas umidades relativas.

O tratamento liofilizado elaborado com 10 % de polidextrose foi o que resultou em maior retenção de antocianinas (77 %), atividade antioxidante por DDPH (90 %) e HRSA (74 %), maior higroscopicidade (39,4 %) e menor diferença de cor (ΔE) em relação ao cálice de hibisco *in natura*, conforme pode ser observado nas Tabelas 1, 2 e 3 do Capítulo 3.

Foi possível obter pós microencapsulados provenientes do extrato aquoso obtido por EAM dos cálices de hibisco, usando polidextrose e proteína isolada do soro de leite. Com os resultados obtidos, os pós microencapsulados podem ser considerados uma fonte de compostos funcionais, além de poderem ser utilizados como corante natural em produtos acidificados devido ao seu caráter ácido, empregado para garantir a estabilidade das antocianinas presentes.

PERSPECTIVAS

- Verificar o efeito do tempo e da potência sobre as paredes celulares do cálice do hibisco;
- Realizar estudos para separar o efeito da temperatura e das micro-ondas;
- Realizar estudos de purificação no extrato aquoso para selecionar apenas os compostos bioativos;
- Utilização de diferentes combinações de bgfvb materiais de parede prebióticos na elaboração de micropartículas de extrato fenólico de hibisco;
- Estudar outros parâmetros de atomização e concentrações dos agentes encapsulantes;
- Estudar a aplicação em alimentos, como iogurtes, bebidas lácteas, gelatinas, e avaliar a estabilidade dos compostos bioativos nas mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, M., Akter, M. S., Lee, J., Eun, J. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. **Food Science and Technology**, 43 (9), 307-1312, 2010.
- Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A., Rafiee, S. The correlation of wall material composition with flow characteristics and encapsulation behavior of fish oil emulsion. *Food Research International*, 49, 379-388, 2012.
- Aimutis, W. L. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. **Journal of Nutrition**, 134(4), 989S-995s, 2004.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K, Hagen, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 90, 7915-7922, 1993.
- Angelo, P. M., Jorge, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66 (1), 1-9, 2007.
- Aspé, E., Fernández, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus rodiata* Bark. **Industrial Crops and Products**, 34, 838-844, 2011.
- Aurelio, D. L., Edgardo, R. G., Navarro-Galindo, S. Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion. **International Journal of Food Science and Technology**, 43 (2), 322-325, 2008.
- Azeredo, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, 16 (1), 89-97, 2005.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, 117, 426-36, 2013.
- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., Mussatto, S. I. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. **Food Chemistry**, 237, 623-631, 2017.
- Barboza, A. C. R. N., Cruz, C. V. M. S., Graziani, M. B., Lorenzetti, M. C. F., Sabadini, E. Aquecimento em forno de microondas / desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais. **Química Nova**, 24 (6), 901-904, 2001.
- Barhé, T. A., Tchouya, G. R. F. Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus sabdariffa* L., *Glycine max* L. Merr., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. **Arabian Journal of Chemistry**, 9, 1-8, 2016.

Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., David, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa dos organismos. **Química Nova**, 29 (1), 113-123, 2006.

Bianchi, M. L. P., Antunes, L. M. G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, 12 (2), 123-130, 1999.

Blasco, A. J., Rogerio, M. C., González, M. C., Escarpa, A. “Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in food: A proposal. **Analytica Chimica Acta**, 539, 237-244, 2005.

Bordignon, C. L., Francescato, V., Nienow, A. A., Calvete, E., Reginatto, F. H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 29 (1), 183-188, 2009.

Boss, E. A. Modelagem e otimização do processo de liofilização: Aplicação para leite desnatado e café solúvel. Campinas, 2004. 107p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas. 2004.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, 28, 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 02 de janeiro de 2002.

Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, 56 (11), 317-333, 1998.

Brazel, C.S. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. **Cereal Foods World**, 44 (6), 388-393, 1999.

Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., Abram, M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. **Food Chemistry**, 127, 1821-1827, 2011.

Bunting, C. Sugar Free Ingredient. **The Manufacturing Confectioner**, 55-58, 1994.

Burda, S., Oleszek, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49, 2774, 2001.

Burdock, G. A., Flamm, W. G. A review of the studies of the safety of polydextrose in food. **Food and Chemical Toxicology**, 37, 233-264, 1999.

Cândido, L. M. N., Campos, A. M. Alimentos para fins especiais: diabéticos. São Paulo: Livraria Varela, 423, 1996.

Carvalho, C., Santos, G. Global Communities, Biotechnology and Sustainable Design – Natural / Bio Dyes in Textiles. **Procedia Manufacturing**, 3, 6557-6564, 2015.

Castro, N. E. A., Pinto, J. E. B. P., Cardoso, M. G., Morais, A. R., Bertolucci, S. K. V., Silva, F. G., Delú Filho, N. Planting time for maximization of yield of vinegar plant calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, 28 (3), 542-551, 2004.

- Chang, Q., Zuo, Z., Chow, M. S. S., Ho, W. K. K. Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. major) fruits and a hawthorn drink. **Food Chemistry**, 98, 426-430, 2006.
- Chemat, F., Esveld, E. Microwave Super-Heated Boiling of Organic Liquids: Origin, Effect and Application. **Chemical Engineering & Technology**, 24, 735, 2001.
- Chen, L., Remondetto, G. E., Subirade, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, 17, 272-283, 2006.
- Cissé, M., Bohuon, P., Sambe, F., Kane, C., Sakho, M., Dornier, M. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. **Journal of Food Engineering**, 109 (1), 16-21, 2012.
- Cissé, M., Dornier, M., Sakho, M., Diop, C. M., Reynes, M., Sock, O. La production de bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) au Sénégal. **Fruits** 64 (1), 1-14, 2009.
- Costa, S. B., Duarte, C., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C.; Serra, A. T.; Martins, M. M.; Januário, M. I N.; Vicente, A. A.; Delgadillo, I, Duarte, C.; Costa, M. L. B. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. **Journal of Food Engineering**, 110 (2), 190-199, 2012.
- Crossley, J. I., Aguilera, J. M. Modeling the effect of microstructure on food extraction. **Journal of Food Process Engineering**, 24, 161-17, 2001.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, 26, 1001-1043, 2009.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., Heinrich, M. *Hibiscus sabdariffa* L. - A phytochemical and pharmacological review. **Food Chemistry**, 165, 424-443, 2014.
- Dai, J., Mumper, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, 15, 7313-7352, 2010.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, 40 (3), 173-289, 2000.
- Denver, S., Christensen, T. Organic food and health concerns: a dietary approach using observed data. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, 74-75, 9-15, 2015.
- Desobry, S., Debeaufort, F. Encapsulation of flavors, nutraceuticals and antibacterials. In: BALDWIN, E., HAGENMAIER, R., BAI, J. (Ed.). **Edible coatings and films to improve food quality**. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 333-372. 2011.
- Dijk, M., Dijk, F. J., Bunschoten, A., Dartel, D. A. M., Norren, K., Walrand, S., Jourdan, M., Verlaan, S., Luiking, Y. Improved muscle function and quality after diet intervention with

leucine-enriched whey and antioxidants in antioxidant deficient aged mice. **Oncotarget**, 7 (14), 2016.

Duangmal, K., Saicheua, B., Sueeprasan, S. Color evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. **Food Science and Technology**, 41, 1437-1445, 2008.

Duke, J. A., Atchley, A. A. Proximate analysis. In: The handbook of plant Science in agriculture. Boca Raton, 1984.

Fang, Z., Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Tends in Food Science & Technology**, 21 (10), 510-523, 2010.

Farombi, E. O., Ige, O. O. Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 21, 601-9, 2007.

Favaro-Trindade, C. S., Pinho, S. C., Rocha, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, 11 (2), 103-112, 2008.

Fay, L. B., Kussmann, M. Mass Spectrometry and Nutrition Research. **Royal Society of Chemistry**, 6, 172, 2010.

Fellows, P. Food Processing Technology: Principles and Practice. 1st Edition, Ellis Horwood, Southmpton, 550, 1988.

Fernandes, L. P., Candido, R. C., Oliveira, W. P. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. **Food and Bioproducts Processing** 90, 425–432, 2012.

Flood, M. T., Auerbach, M. H., Craig, S. A. S. A review of clinical toleration studies of polydextrose in food. **Food and Chemical Toxicology**, 42, 1431-1542, 2004.

Formagio, A. S. N., Ramos, D. D., Vieira, M. C., Ramalho, S. R., Silva, M. M., Zárte, N. A. H., Foglio, M. A., Carvalho, J. E. Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. **Brazilian Journal of Biology**, 75, 69-75, 2015.

Fraga, C. G. Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology. New Jersey: Wiley & Sons, 2009.

Francis, F. J. Anthocyanins and betalainis: composition and applications. **Cereal Foods World**, 45, 208-213, 2000.

Freitas, N. M., Santos, A. M. C. M., Moreira, L. R. M. O. Avaliação fitoquímica e determinação de minerais em amostras de *Hibiscus sabdariffa* L. (vinagreira). **Cadernos de Pesquisa**, 20 (3), 2013.

- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. **Molecules**, 15, 8813-8826, 2010.
- George, J.P., Datta, A.K. Development and validation of heat and mass transfer models for freeze-drying of vegetables slices. **Journal of Food Engineering**, (52), 89-93, 2002.
- George, S., Tourniaire, F., Gautier, H., Goupt, P., Rock, E., Carisveyrat, C. Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilization of red and yellow tomatoes. **Food Chemistry**, 124, 1603-1611, 2011.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 50 (3), 213-224, 1999.
- Gibis, M., Zeeb, B., Weiss, J. Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. **Food Hydrocolloids**, 38, 28-39, 2014.
- Gunasekaran, S., Ko, S., Xiao, L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. **Journal of Food Engineering**, 83, 31–40, 2007.
- Gunasekaran, S, Xiao, L., Eleya, M. M. O. Whey protein concentrate hydrogels as bioactive carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, 99, 2470–2476, 2006.
- Hamri, S. Z., Zeghichi, M., Chibane, M., Kallithraka, S., Benhalima, A. What is so special about the Mediterranean diet in the Maghreb? The role of economics in eating choices and chronic diseases outcomes. **Annals of Nutrition and Metabolism**, 58, 191-216, 2011.
- Haraguchi, F. K., Abreu, W. C., Paula, H. Whey protein: composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. **Revista de Nutrição**, 19 (4), 479-488, 2006.
- Herrera-Arellano, A., Miranda-Sánchez, J., Avila-Castro, P., Herrera-Alvarez, S., Jiménez-Ferrer, J. E., Zamilpa, A., Román-Ramos, R., Ponce-Monter, H., Tortoriello, J. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. **Planta Medica**, 73, 6-12, 2007.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, 126 (4), 1821-1835, 2011.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, 26 (7), 816-835, 2008.
- Jeong, J. Y., Park, M. N., Cho, E. S., Jang, H. J., Park, S. K., Lee, H. J. Epigallocatechin-3-gallate-induced free-radical production upon adipogenic differentiation in bovine bone-marrow mesenchymal stem cells. **Cell & Tissue Research**, 362, 87-96, 2015.

Juliani, H. R., Welch, C. R., Wu, Q., Diouf, B., Malainy, D., Simon, J. E. Chemistry and quality of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural-product industry in Senegal. **Journal of Food Science**, 74 (2), 2009.

Jung, E., Joo, N. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and soybean oil effects on quality characteristics of pork patties studied by response surface methodology. **Meat Science**, 94, 391-401, 2013.

Kalla, M. L. M., Jong, E. N., Kayem, J. G., Sreekumar, M. M., Nisha, P. Effect of re-extraction parameters and drying temperature on the antioxidant properties and dietary fiber of Red sorrel (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces residues. **Industrial Crops and Products**, 74, 680–688, 2015.

Kappe, C. O., Dallinger, D., Murphree, S. S. Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists, Wiley-VCH: Weinheim, Alemanha, 2009.

Kawanishi, S., Murata, M., Takahashi, A., Saito, I. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, 32, 822-32, 2002.

Khazaei, K. M., Jafari, S. M., Ghorbani, M., Kakhki, A. H. Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. **Carbohydrate Polymers**, 105, 57-62, 2014.

King, A. H. Encapsulation Of Food Ingredients. In: Risch, S. J., Reineccius, G. A. Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: ACS, 26-39. (ACS Symposium. Series, 590), 1995.

Kinsella, J. E. Whitehead DM. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, 33, 343-438, 1989.

Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. **Progress in Lipid Research**, 46, 244-282, 2007.

Lans, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 2, 45, 2006.

Larhed, M., Moberg, C., Hallberg, A. Microwave-accelerated homogeneous catalysis in organic chemistry. **Accounts of Chemical Research**, 35, 717, 2002.

Latha, C. Microwave assisted extraction of embelin from *Embelia ribes*. **Biotechnology Letters**, 29 (2), 319-22, 2007.

Lazzé, M. C., Pizzala, R., Savio, M., Stivala, L. A., Prospero, E., Bianchi, L. Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. **Mutation Research**, 535, 103-115, 2003.

Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, 88 (5), 1269-1278, 2005.

Lee, S. J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidante properties. **Food Chemistry**, 91 (1), 131-137, 2005.

Leimann, F. V., Gonçalves, O. H., Machado, R. A. F., Bolzan, A. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. **Materials Science and Engineering**, 29 (2), 430-436, 2009.

Li, S., Chen, G., Zhang, C., Wu, M., Wu, S., Liu, Q. Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. *Food Science and Human Wellness* 3, 110-116, 2014.

Lin, H. H., Chen, J. H., Kuo, W. H., Wang, C. J. Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. **Chemico-Biological Interactions**, 165 (1), 59-75. 2007.

Lupano, C. E. Gelation of mixed systems whey protein concentrate - gluten in acidic conditions. **Food Research International**, 33, 691-696, 2000.

Lutz, M., Jorquera, K., Cancino, B., Ruby, R., Henriquez, C. Phenolics and antioxidant capacity of table grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars grown in Chile. **Journal of Food Science**, 76 (7), 1088-1093, 2011.

Ma, C., Yang, L., Yang, F., Wang, W., Zhao, C., Zu, Y. Content and Color Stability of Anthocyanins Isolated from *Schisandra chinensis* Fruit. **International Journal of Molecular Sciences**, 13, 2012.

Maciel, M. J., Paim, M. P., Carvalho, H. H. C., Wiest, J. M. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 71 (3), 462-70, 2012.

Madej, K. Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 28, 436-446, 2009.

Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpoor, E., Dehnad, D. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 85, 379-85, 2016.

Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, 100, 1409-1418, 2007.

Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. **Pharmacognosy Reviews**, 1(1), 7-18, 2007.

Markakis, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.) Anthocyanins as Food Colors. New York: Academic Press, 163-180, 1982.

Martins, M. A. S. Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.): uma riqueza pouco conhecida. **Embrapa**, 12-17, 1990.

Mazza, G., Miniati, E. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Boca Raton, CRC Press, 362, 1993.

McKay, D. L., Chen, C. O., Saltzman, E., Blumberg, J. B. *Hibiscus Sabdariffa* L. Tea (Tisane) Lowers Blood Pressure in Prehypertensive and Mildly Hypertensive Adults. **The Journal of Nutrition**, 140 (2), 298-303, 2010.

Mecocci, P., Polidori, M. C., Troiano, L., Cherubini, A., Cecchetti, R., Pini, G., Straatman, M., Monti, D., Stahl, W., Sies, H., Franceschi, C., Senin, U. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. **Free Radical Biology and Medicine**, 28 (8), 1243-1248, 2000.

Mohamed, R., Fernández, J., Pineda, M., Aguilar, M. Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seed oil is a rich source of γ -tocopherol. **Journal of Food Science**, 72, 207-211, 2007.

Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P., Araújo, E. L., Amorim, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, 28 (5), 892-896, 2005.

Moppet, F. K. Polydextrose. In: Alternative Sweeteners. Nova Iorque, Marcel Dekker, 401-421, 1991.

Morton, J. F. Roselle. Fruits of warm climates. Miami: Published by Julia F. Morton, 281-286, 1987.

Morton, L. W., Caccetta, R. A. A., Puddey, I. B., Croft, K. D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 27, 152-159, 2002.

Moura, S. C. S. R., Berlingb, C. L., Germerc, S. P. M., Alvimd, I. D., Hubingera, M. D. Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, 241, 317-327, 2018.

Munin, A., Edwards-Lévy, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds, a review. **Pharmaceutics**, 3 (4), 793-829, 2011.

Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I, Martínez-Bustos, F. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. **Journal of Food Engineering**, 91 (3), 380-386, 2009.

Nachtigall, A. M., Zambiazzi, R. C., Carvalho, D. S. **Geléia light de hibisco: características físicas e químicas**. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, 15 (2), 155-161, 2004.

Naczka, M., Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, 1054, 95-111, 2004.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V. Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, 42 (1), 469-479, 2013.

Neves, C. F. C., Schwartzman, M. M. A. M., Jordão, E. Técnica para seleção de variáveis aplicada à separação de gases. **Química Nova**, 25 (2), 327-329, 2002.

Oliveira, G., R., Santos, J. T. S., Campos, A. F. P., Nunes, T. P., Russo, S. L., Oliveira Junior, A.M. Prospecção Tecnológica: Processo de liofilização na indústria de alimentos. **Revista GEINTEC**, 3 (1), 92-102, 2012.

Oliveira, D. S. Nova metodologia para extração de compostos fenólicos de vinho tinto e avaliação da estabilidade dos extratos obtidos. 138f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, MG, 2014.

OMS - Organização Mundial de Saúde. Growth reference data for 5-19 years. 2007. Disponível em: http://www.who.int/growthref/who2007_bmi_for_age/en/index.html.

Ordóñez, J. A. Tecnologia de alimentos: Componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, 1, 2005.

Panizza, S. Plantas que curam: cheiro de mato. 2. ed. São Paulo (SP): IBRASA, 1997.

Patel, S. *Hibiscus sabdariffa*: An ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, 4, 23-27, 2014.

Peleg, H., Bodine, K. K., Noble, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, 23 (3), 371-8, 1998.

Petigny, L., Périno, S., Minuti, M., Visinoni, F., Wajsman, J., Chemat, F. Simultaneous Microwave Extraction and Separation of Volatile and Non-Volatile Organic Compounds of Boldo Leaves. From Lab to Industrial Scale. **International Journal of Molecular Sciences**, 15, 2014.

Piovesana, A., Noreña, C. P. Z. Microencapsulation of Bioactive Compounds from Hibiscus Calyces Using Different Encapsulating Materials. **International Journal of Food Engineering**, 2018.

Pitalua, E., Jimenez, M., Vernon-Carter, E. J., Beristain, C. I. Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. **Food and Bioprocess Processing**, 88, 253-258, 2010.

Podsdek, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT- Food Science and Technology**, 40, 1-11, 2007.

Polak, R., Pitombo, R. N. M. Care during freeze-drying of bovine pericardium tissue to be used as a biomaterial: A comparative study. **Cryobiology**, 63, 61-66, 2011.

- Poshadri, A., Kuna, A. Microencapsulation technology: a review. **Journal of Research ANGRAU**, 38(1), 86-102, 2010.
- Probert, H. M., Apajalahti J. H. A., Rautonen, N., Stowell, J., Gibson, G. R. Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. **Applied and Environmental Microbiology**, 4505-4511, 2004.
- Raninem, K., Lappi, J., Mykkänen, H., Poutanen, K. Dietary fiber type reflects physiological functionality: comparison of grain fiber, inulin and polydextrose. **Nutrition Reviews**, 69 (1), 9-21, 2011.
- Ramos, D. D., Vieira, M. C., Formagio, A. S. N., Cardoso, C. A. L., Ramos, D. D., Carnevali, T. O. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. **Ciência Rural**, 41 (8), 2011.
- Ratti, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, 49, 311-319, 2001.
- Ré, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, 16, 1195-1236, 1998.
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., Pinto, M. S. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 75 (3), 588-602, 2012.
- Reineccius, G. A. In: Rish, S. J., Reineccius, G. A. (Ed.). Flavor encapsulation. Washington: American Chemical Society, 55-66. (ACS Symposium Series, 370). 1988.
- Ricárdez, O. F. M., Jiménez, J.R., Rivera, L. L., Castro, M. D. L. Fast Ultrasound assisted Extraction of Polar (phenols) and Nonpolar (lipids) Fractions in *Heterotheca inuloides* Cass. **Phytochemistry**. 22, 484-491, 2011.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, 20 (7), 933-956, 1996.
- Risch, S.J. Encapsulation: overview of uses and techniques. In: Risch, S.J., Reineccius, G.A. Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: ACS, 2-7. (ACS Symposium. Series, 590), 1995.
- Rodríguez-Medina, I. C., Beltrán-Debón, R., Molina, V. M., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. **Journal of Separation Science**, 32, 3441-3448, 2009.
- Roller, S., Jones, S. A. Handbook of Fat Replacers, by **CRC Press**, 1996.
- Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiasi, R. C., Nunes, M. R., Benvenutti, E. V., Luz, S. R., D'Avila, R. F., Rutz, J. K. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, 46, 138-146, 2013.

Rosini, F., Nascentes, C. C., Nóbrega, J. A. Experimentos didáticos envolvendo radiação micro-ondas. **Química Nova**, 27, 1012, 2004.

Sayago-Ayerdi, S. G., Arranz, S., Serrano, J., Goñi, I. Dietary fiber content and associated antioxidante compounds in Roselle flowers (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55 (19), 2007.

Sanseverino, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, 25 (4), 660-667, 2002.

Santana, A. A., Oliveira, R. A., Pinedo, A. A., Kurozawa, L. E., Park, K. J. Microencapsulation of babassu coconut milk. **Food Science and Technology**, 33 (4), 737-744, 2013.

Santos, A. B., Ferreira, V. P., Grosso, C. R. F. Microcápsulas: uma alternativa viável: microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleoresina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 3 (16), 26-30, 2000.

Schuck, P., Jeantet, R., Carvalho, A. F. Lactose Crystallization and drying of whey. Viçosa, MG: UFV. Curso ministrado na disciplina TAL 795 Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, 2010.

Schuck, P., Dolivet, A., Jeantet, R. Analytical methods for food and dairy powders. Chichester: Wiley-Blackwell, 248, 2012.

Shahidi, F., Han, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 33 (6), 501-547, 1993.

Shahidi, F., Janitha, P. K., Wanasundara, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 32 (1), 67-103, 1992.

Shayganni, E., Bahmani, M., Asgary, S., Rafieian-Kopaei, M. Inflammaging and cardiovascular disease: Management by medicinal plants. **Phytomedicine**, 23, 1119-1126, 2016.

Silva, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II., aplicação de métodos de microencapsulação. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 39 (1), 1-9, 2003.

Silva, M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. S., Koblitz, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, 31 (3), 669-682, 2010.

Silva, E. K., Azevedo, V. M., Cunha, R. L.; Hubinger, M. D.; Meireles, M. A. A. Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Whey protein isolate versus modified starch. **Food Hydrocolloids**, 56, 71-83, 2016.

Silveira, A. C. P.; Perrone, I. T.; Rodrigues, P. H; Carvalho, A. F. Secagem por spray: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 68 (391), 51-58, 2013.

Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., Shivakumar, H. G. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in pharmaceutical sciences*, 5 (2), 65-77, 2010.

Soottitantawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., Linko, P. Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated dlimonene by spray drying. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6 (1), 107-114, 2005.

Souza, R. O. M. A., Miranda, L. S. M. Irradiação de micro-ondas aplicada à síntese orgânica: uma história de sucesso no Brasil. *Química Nova*, 24, 497. 2011.

Suave, J., Dall'agnol, E. C., Pezzin, A. P. T., Silva, D. A. K., Meier, M. M., Soldi, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, 7 (2), 12-20, 2006.

Sun, H., Ge, X., Ly, Y., Wang A. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *Journal of Chromatography A*, 1237, 1-23, 2012.

Sun, Y. C. Health concern, food choice motives, and attitudes toward healthy eating: The mediating role of food choice motives. *Appetite*, 51, 42-49, 2008.

Suppadit, T., Sunthorn, N., Pounsuk, P. Use of anthocyanin extracted from natural plant materials to develop a pH test kit for measuring effluent from animal farms. *African Journal of Biotechnology*, 10 (82), 19109-19118, 2011.

Susantikarn, P., Donlao, N. Optimization of green tea extracts spray drying as affected by temperature and maltodextrin content. *International Food Research Journal*, 23 (3), 1327-1331, 2016.

Tavares, G. M., Croguennec, T., Carvalho, A. F., Bouhallab, S. Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 37, 5-20, 2014.

Tavares, T. G., Contreras, M. M., Amorim, M., Martín-Álvarez, P. J., Pintado, M. E., Recio, I., Malcata, F. X. Optimization, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. *International Dairy Journal*, 21, 926-933, 2011.

Terigar, B. G., Balasubramanian, S., Boldor, D., Xu, Z., Lima, M., Sabliov, C. M. Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: Design and performance evaluation. *Bioresource Technology*, 101 (7), 2466-2471, 2010.

Tolstoguzov, V. B. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4, 429-468, 1991.

Torkamani, A. E., Syahariza, Z. A., Norziah, M. H., Wan, A. K. M., Juliano, P. Encapsulation of polyphenolic antioxidants obtained from *Momordica charantia* fruit within zein/gelatin

shell core fibers via coaxial electrospinning. **Food Bioscience**, 21, 60-71, 2018.

Tsai, P., Mcintosh, J., Pearce, P., Camden, B., Jordan, B. R. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. **Food Research International**, 35, 2002.

Tsai, P., Huang, H. Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in roselle. **Food Research International**, 37, 313-318, 2004.

Tseng T. H., Kao E. S., Chu C. Y., Chou F. P.; Lin W.; Wang C. J. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, 35, 1159-64, 1997.

Tsukui, A., Rezende, C. M. Extração assistida por micro-ondas e química verde. **Revista Virtual de Química**, 6 (6), 1713-1725, 2014.

Veggi, P. C., Martinez, J., Meireles, M. A A. Fundamentals of microwave extraction. F. Chemat and G. Cravotto (eds.), Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice, **Food Engineering Series**, 4, 2015.

Venkatesan, P., Manavalan, R., Valliappan, K. Encapsulation: A vital technique in novel drug delivery system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1 (4), 26-35, 2009.

Vinson, J. A., Jang, J., Yang, J., Dabbagh, Y., Liang, X., Serry, M., Proch, J., Cai, S. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 2502-2504, 1999.

Vizzotto, M., Pereira, M. C. Amora-preta (*Rubus* sp.): Otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33 (4), 1209-1214, 2011.

Wahyuningsih, S., Wulandari, L., Wartono, M. W., Munawaroh, H., Ramelan, A. H. The effect of pH and color stability of anthocyanin on food colorant. **Materials Science and Engineering**, 193, 2017.

Walkowiak-Tomczak, D., Czapski J. Colour changes of a preparation from red cabbage during storage in a model system. **Food Chemistry**, 104, 709-714, 2007.

Wang, L. J., Weller, C. L. Recent advances in extraction of natural products from plants. **Trends in Food Science and Technology**, 17, 300-312, 2006.

Wang, W. D., Xu, S. Y. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. **Journal of Food Engineering**, 82 (3), 271-275, 2007.

Wong, P. K., Yusof, S., Ghazali, H. M., Man, Y. B. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Nutrition and Food Science**, 32, 68-73, 2002.

Wu, T., Yan, J., Liu, R., Marcone, M. F., Aisa, H. A., Tsao, R. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstream waste using orthogonal array design. **Food Chemistry**, 133, 1292-1298, 2012.

Xiong, W., Chen, X., Lv, G., Hu, D., Zhao, J., Li, S. Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive alkaloids from lotus plumule using response surface methodology. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 6, 382-388, 2016.

Yang, L., Qu, H., Mao, G., Zhao, T., Li, F., Zhu, B., Zhang, B., Wu, X. Optimization of subcritical water extraction of polysaccharides from *Grifola frondosa* using response surface methodology. **Pharmacognosy Magazine**, 9 (34), 120-129, 2013.

Zhang, D., Zu, Y., Fu, Y., Wang, W., Zhang, L., Luo, M., Um, F., Yao, X., Duan, M. Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from pigeon pea roots and the antioxidant activity. *Separation and purification Technology*, 102, 26-33, 2013.

Zhen, J., Villani, T. S., Guo, Y., Qi, Y., Chin, K., Pan, M., Ho, C., Simon, J. E., Wu, Q. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. **Food Chemistry**, 190, 673-680, 2016.